



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Off enlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 30 996 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 31/711**

35

②① Aktenzeichen: 102 30 996.5  
②② Anmeldetag: 9. 7. 2002  
④③ Offenlegungstag: 17. 7. 2003

DE 102 30 996 A 1

③⑩ Unionspriorität:  
PCT/EP02/00151 09. 01. 2002 EP  
PCT/EP02/00152 09. 01. 2002 EP  
  
⑦① Anmelder:  
Ribopharma AG, 95326 Kulmbach, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Dr. Gassner & Partner, 91052 Erlangen

⑦② Erfinder:  
Ocker, Matthias, Dr., 91052 Erlangen, DE; Herold,  
Christoph, Dr., 91054 Erlangen, DE; Geick, Anke, Dr.,  
95447 Bayreuth, DE; Schuppan, Detlef, Prof. Dr.,  
91088 Bubenreuth, DE; Vornlocher, Hans-Peter, Dr.,  
95448 Bayreuth, DE; Limmer, Stefan, Priv. Doz. Dr.,  
95512 Neudrossenfeld, DE; Kreutzer, Roland, Priv.  
Doz. Dr., 95466 Weidenberg, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms  
⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Behandlung  
eines Pankreaskarzinoms, wobei das Medikament eine zu  
einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeig-  
nete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.

DE 102 30 996 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms sowie eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments.

5 [0002] Das Pankreaskarzinom bzw. Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den Karzinomen mit den schlechtesten Prognosen. Über die Ursachen der Entstehung des Pankreaskarzinoms ist wenig bekannt. Eine ausreichend erfolgreiche Therapie existiert bisher nicht. Neben anderen genetischen Veränderungen weisen die Zellen des Pankreaskarzinoms häufig eine Mutation im K-ras-Gen auf. Mutationen wurden dabei vor allem in den Codons 12, 13 und 61 nachgewiesen. Das K-ras-Gen ist ein Proto-Onkogen, welches für das GTP-bindende Protein K-ras kodiert. K-ras ist üblicherweise auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Zellen lokalisiert und mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen assoziiert. 10 Bindung von GTP aktiviert K-ras. Die Inaktivierung erfolgt durch hydrolytische Abspaltung eines Phosphatrests vom gebundenen GTP. Durch Freisetzen des dabei gebildeten GDPs und erneutem Binden von GTP kann K-ras wieder aktiviert werden. Die genannten Mutationen können zu einem Austausch einer Aminosäure in K-ras und dadurch zu dessen permanenter Aktivierung führen. Die Aktivierung von K-ras aktiviert unter anderem Protein-Kinase C.

15 [0003] Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen.

[0004] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein wirksames Medikament und eine Verwendung zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms bereitgestellt werden. Weiterhin soll eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments bereitgestellt werden. 20

[0005] Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 18 und 19 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 17 und 20 bis 36.

[0006] Erfindungsgemäß ist ein Medikament zur Behandlung eines, insbesondere humanen, Pankreaskarzinoms vorgesehen, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält. Die Expression kann durch die dsRNA nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt werden. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der 30 dsRNA enthaltenen Strang.

[0007] Das Medikament kann die dsRNA in einer zu der Hemmung der Expression des K-ras-Gens in dem Pankreaskarzinom ausreichenden Menge enthalten. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausreichende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge hängt von der Verabreichungsform ab. Zur Ermittlung einer ausreichenden Menge kann die dsRNA in steigenden Mengen bzw. Dosierungen verabreicht werden. Danach kann an einer aus dem Pankreaskarzinom entnommenen Gewebeprobe mit bekannten Methoden ermittelt werden, ob bei dieser Menge eine Hemmung der Expression des K-ras-Gens eingetreten ist. Bei den Methoden kann es sich z. B. um molekularbiologische, biochemische oder immunologische Methoden handeln. 35

[0008] Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass durch die Behandlung mittels dsRNA, welche gezielt die Expression des K-ras-Gens hemmen kann, die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen gehemmt und sogar die Zahl vitaler Tumorzellen reduziert werden kann. Erstaunlicherweise bleibt das Proliferationsverhalten nicht maligner Zellen weitgehend unbeeinflusst von einer solchen Behandlung. Das Medikament kann eine Steigerung der Apoptose-Rate in den Zellen des Pankreaskarzinoms bewirken. In vivo ist es durch ein solches Medikament möglich, das Wachstum eines Pankreastumors effektiv zu hemmen. 40

[0009] Das K-ras-Gen kann derart mutiert sein, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird. Die Hemmung der Expression eines solchen Gens durch das erfindungsgemäße Medikament bewirkt eine besonders effektive Hemmung des Wachstums des Pankreaskarzinoms. Das K-ras-Gen kann dabei in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert sein. Im mutierten K-ras-Gen kann das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodieren. Im Wildtyp des K-ras-Gens kodiert das Codon 12 und das Codon 13 jeweils für Glycin und das Codon 61 für Glutaminsäure. 45

[0010] Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Unter dem "K-ras-Gen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen für K-ras kodierenden DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem K-ras-Gen handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des K-ras-Gens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z. B. einer mRNA, sein. 50

[0011] Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, vorzugsweise 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des K-ras-Gens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. 55

[0012] Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des K-ras-Gens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet. 60

[0013] Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des

einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. In einem Ausführungsbeispiel weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d. h. ohne Überhänge, ausgebildet. Eine solche dsRNA hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut und Serum als besonders beständig erwiesen.

[0014] Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d. h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Der Strang S1 oder der Strang S2 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär sein. Vorzugsweise besteht die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des K-ras-Gens besonders wirksam.

[0015] Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegen. Eine micellare Struktur oder ein Kapsid kann die Aufnahme der dsRNA in die Tumorzellen erleichtern. Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Puffer gelöste und verabreichte dsRNA von den Tumorzellen aufgenommen wird und die Expression des K-ras-Gens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

[0016] Vorzugsweise ist die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht, insbesondere 200 µg pro kg Körpergewicht, entspricht. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser pro Tag verabreichten Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des K-ras-Gens aufweist.

[0017] Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms vorgesehen. Weiterhin ist erfindungsgemäß die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms vorgesehen.

[0018] Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verwendungen wird auf die vorangehenden Ausführungen verwiesen.

[0019] Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Als Abkürzung der Konzentrationsangabe "mol/l" wird dabei "M" verwendet. Es zeigen:

[0020] Fig. 1 die prozentuale Apoptose-Rate von humanen Pankreaskarzinomzellen YAP C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Transfektion mit einer zu einer ersten Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen komplementären dsRNA,

[0021] Fig. 2 die Anzahl vitaler Zellen nach Transfektion mit einer dsRNA und

[0022] Fig. 3 das Volumen subkutan implantierter humaner Pankreasadenokarzinome in NMRI-Mäusen.

[0023] Die eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 8 bezeichneten, Sequenzen auf:

KRAS1, welche zu einer ersten Punktmutation im Codon 12 aufweisenden Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen in YAP C-Zellen komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc ugu ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 1)

S1: 3'-ca uca acc ucg aca acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 2)

KRAS1', welche zu einer ersten Punktmutation im Codon 12 aufweisenden Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen in einem humanen subkutan in NMRI-Mäusen implantierten Pankreasadenokarzinom komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc uga ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 3)

S1: 3'-ca uca acc ucg acu acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 4)

KRAS2, welche zu einer Wildtyp-Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc ugg ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 5)

S1: 3'- ca uca acc ucg acc acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 6)

NEO, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen komplementär ist:

S2: 5'- c aag gau gag gau cgu uuc gca-3' (SEQ ID NO: 7)

S1: 3'-ucu guc cua cuc cua gca aag cg -5' (SEQ ID NO: 8)

[0024] Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie YAP C, welche unter der Nr. ACC 382 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig bezogen werden können, wurden unter konstanten Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640-Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS)

und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

[0025] Die Transfektionen wurden in einer 6-Well-Platte mit Oligofectamine (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Pro Well wurden 150 000 Zellen ausgesetzt. Die Transfektion der doppelsträngigen Oligoribonukleotide wurde nach dem von Invitrogen für Oligofectamine empfohlenen Protokoll durchgeführt (Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung

5 bzw. ein Well einer 6-Well-Platte):

10  $\mu$ l des doppelsträngigen Oligoribonukleotids (0,1–10  $\mu$ M) wurden mit 175  $\mu$ l Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt. 3  $\mu$ l Oligofectamine wurden mit 12  $\mu$ l Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das so verdünnte Oligofectamine wurde zu den bereits verdünnten doppelsträngigen Oligoribonukleotiden gegeben, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit Zellkulturmedium ohne Zusätze gewaschen und 800  $\mu$ l frisches Zellkulturmedium zugegeben. Danach wurden pro Well 200  $\mu$ l des beschriebenen Oligofectamine-dsRNA-Gemisches zugegeben, so dass das Endvolumen für die Transfektion 1000  $\mu$ l betrug. Hierdurch ergibt sich eine Endkonzentration der doppelsträngigen Oligoribonukleotide von 1–100 nM. Der Transfektionsansatz wurde vier Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurden pro Well 500  $\mu$ l Zellkulturmedium mit 30% FKS zugegeben, so dass die Endkonzentration an FKS 10% betrug. Dieser Ansatz wurde für 24 bis

15 120 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0026] Zur Bestimmung der Apoptose-Rate wurden die Überstände nach der Inkubation gesammelt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und 10 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit hypotoner Propidiumjodidlösung 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch im Fluoreszenz-unterstützten Zellsortierer FACSCalibur (Fa. BD

20 GmbH, Heidelberg).

[0027] Fig. 1 zeigt die prozentuale Apoptose-Rate humaner Pankreaskarzinomzellen YAP C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Transfektion mit steigenden Konzentrationen der dsRNA KRAS1. Daraus ist ersichtlich, dass KRAS1 konzentrationsabhängig Apoptosen in humanen Pankreaskarzinomzellen induziert. Die Apoptose-Rate steigt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an. Während unbehandelte YAP C-Zellen (Kontrolle) und Zellen, mit welchen das beschriebene Verfahren zur Transfektion ohne doppelsträngiges Oligoribonukleotid durchgeführt wurde (Mocktransfektion bzw. Scheintransfektion), auch nach 120 h Inkubation nur maximal 5% Apoptose aufwiesen, konnte durch Transfektion mit 100 nM KRAS1 die Apoptose-Rate nach 120 h auf 24% gesteigert werden. Mit gleicher Effektivität induzierte die zum Wildtyp von K-ras komplementäre dsRNA KRAS2 Apoptose in YAP C-Zellen.

[0028] Zur Bestimmung des Einflusses der Transfektionen auf die Proliferation bzw. die Zahl vitaler Zellen, wurden pro Vertiefung einer 6-Well-Platte 50 000 YAP-C-Zellen ausgesetzt und wie oben beschrieben transfiziert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit der Trypanblau-Ausschluss-Färbung nach 24 bis 120 h Inkubationszeit durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt. Die Proliferation von YAP C-Zellen konnte durch KRAS1 konzentrationsabhängig gehemmt werden. Die Zahl vitaler Zellen konnte bereits durch 1 nM KRAS1 statistisch signifikant ( $p = 0.001$  vs. unbehandelte Kontrolle nach 120 h) reduziert werden.

35 [0029] Eine Transfektion mit der zum K-ras-Wildtyp komplementären dsRNA KRAS2 führte bei einer Konzentration von 100 nM zu einer Reduktion der Zahl vitaler Zellen. Nicht-maligne humane Hautfibroblasten zeigten keine Änderung ihres Proliferationsverhaltens durch Transfektion mit KRAS1 oder KRAS2.

[0030] Für in vivo-Untersuchungen sind NMRI-Mäusen (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) Gewebefragmente von 2–3 mm Durchmesser aus einem humanen Pankreasadenokarzinom subkutan implantiert worden. Nachdem die Tumoren eine Größe von 6–7 mm erreicht hatten, wurden täglich 200  $\mu$ g KRAS1 oder NEO pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurde eine physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die Tumore wurden täglich mittels einer Schiebelehre bzw. einer standardisierten Schablone vermessen. In Fig. 3 ist das in  $\text{mm}^3$  gemessene Tumolvolumen als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts in Abhängigkeit von der Zeit ab Beginn der Behandlung durch die intraperitonealen Injektionen (Tage i. p.) dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die zum K-ras-Gen komplementäre dsRNA in der Lage ist, das Wachstum der Tumore zu hemmen. Durch tägliche intraperitoneale Applikation der zum K-ras-Gen komplementären dsRNA in einer Konzentration von 200  $\mu$ g/kg wurde das Wachstum des Tumors derart gehemmt, dass das Tumolvolumen nach 24 Tagen Behandlung nur 62% des Tumolvolumens der Kontrollgruppe betragen hat.

50

55

60

65

# DE 102 30 996 A 1

## SEQUENZPROTOKOLL

|   |    |    |
|---|----|----|
| <110> Ribopharma AG                                     |    |    |
| <120> Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms |    | 5  |
| <130> 422271EH  |    |    |
| <140>   |    |    |
| <141>   |    | 10 |
| <160> 8   |    |    |
| <170> PatentIn Ver. 2.1                                 |    |    |
| <210> 1   |    | 15 |
| <211> 21  |    |    |
| <212> RNA   |    |    |
| <213> Homo sapiens                                      |    |    |
| <400> 1   |    | 20 |
| aguuggagcu guuggcguag g                                 | 21 |    |
| <210> 2   |    | 25 |
| <211> 23  |    |    |
| <212> RNA   |    |    |
| <213> Homo sapiens                                      |    |    |
| <400> 2   |    | 30 |
| ccuacgcaa cagcuccaac uac                                | 23 |    |
| <210> 3   |    |    |
| <211> 21  |    | 35 |
| <212> RNA   |    |    |
| <213> Homo sapiens                                      |    |    |
| <400> 3   |    | 40 |
| aguuggagcu gauggcguag g                                 | 21 |    |
| <210> 4   |    |    |
| <211> 23  |    |    |
| <212> RNA   |    | 45 |
| <213> Homo sapiens                                      |    |    |
| <400> 4   |    |    |
| ccuacgccau cagcuccaac uac                               | 23 | 50 |
| <210> 5   |    |    |
| <211> 21  |    |    |
| <212> RNA   |    |    |
| <213> Homo sapiens                                      |    | 55 |
| <400> 5   |    |    |
| aguuggagcu gguggcguag g                                 | 21 |    |
| <210> 6   |    | 60 |
|   |    | 65 |

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <211> 23   |    |
|    | <212> RNA  |    |
|    | <213> Homo sapiens   |    |
| 5  | <400> 6  |    |
|    | ccuacgccac cagcuccaac uac  | 23 |
| 10 | <210> 7  |    |
|    | <211> 22   |    |
|    | <212> RNA  |    |
|    | <213> Künstliche Sequenz   |    |
| 15 | <220>  |    |
|    | <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang<br>einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens<br>komplementären dsRNA     |    |
| 20 | <400> 7  |    |
|    | caaggaugag gaucguuucg ca   | 22 |
| 25 | <210> 8  |    |
|    | <211> 23   |    |
|    | <212> RNA  |    |
|    | <213> Künstliche Sequenz   |    |
| 30 | <220>  |    |
|    | <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:<br>Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des<br>Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA |    |
| 35 | <400> 8  |    |
|    | gcgaaacgau ccucauccug ucu  | 23 |

## Patentansprüche

- 40 1. Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.
2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das K-ras-Gen derart mutiert ist, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird.
3. Medikament nach Anspruch 1 oder 2, wobei das K-ras-Gen in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert ist.
- 45 4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im mutierten K-ras-Gen das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodiert.
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
- 50 6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
- 55 8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
9. Medikament nach Anspruch 8, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 60 11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 oder der Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär ist.
13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
- 65 14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung

sung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.

15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

16. Medikament nach Anspruch 15, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

17. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten ist, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht, insbesondere 200 µg pro kg Körpergewicht, entspricht.

18. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms.

19. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms.

20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19, wobei das K-ras-Gen derart mutiert ist, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei das K-ras-Gen in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert ist.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei im mutierten K-ras-Gen das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodiert.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 23, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 25, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 27, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 28, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 29, wobei der Strang S1 oder der Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär ist.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 30, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 31, wobei die dsRNA zur Applikation in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 32, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

34. Verwendung nach Anspruch 33, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 34, wobei die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, verabreicht wird.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 35, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht pro Tag, insbesondere 200 µg pro kg Körpergewicht pro Tag, einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

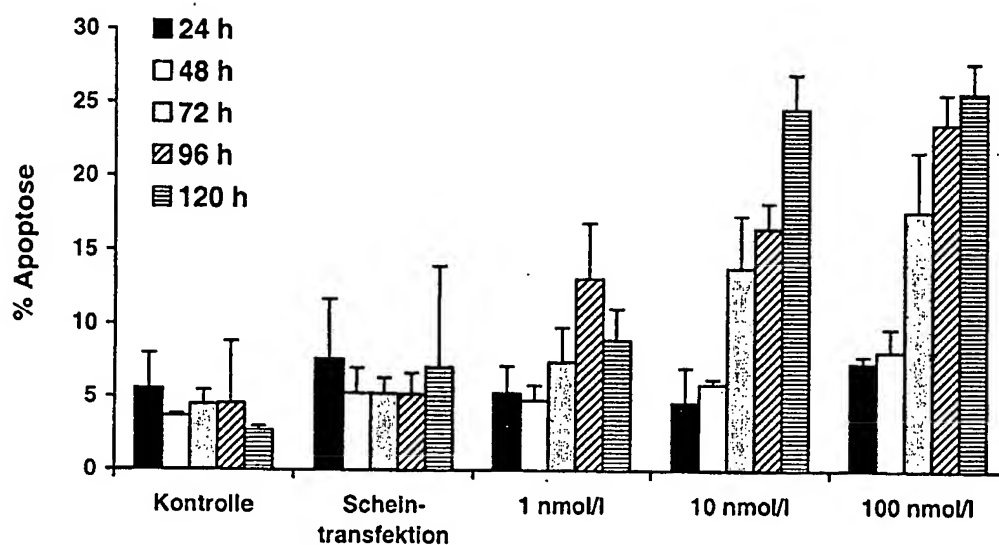


Fig. 1



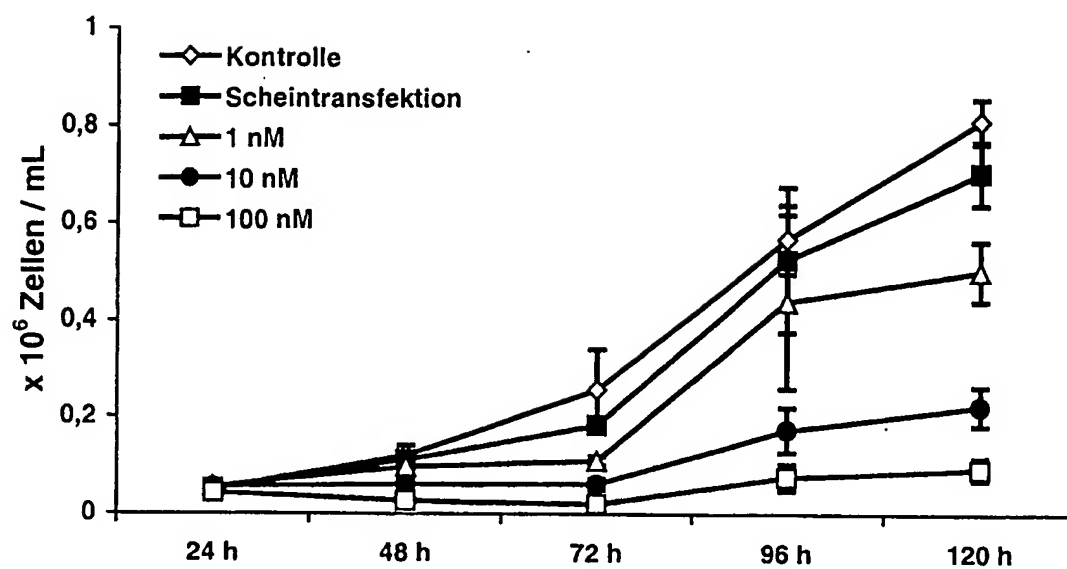


Fig. 2

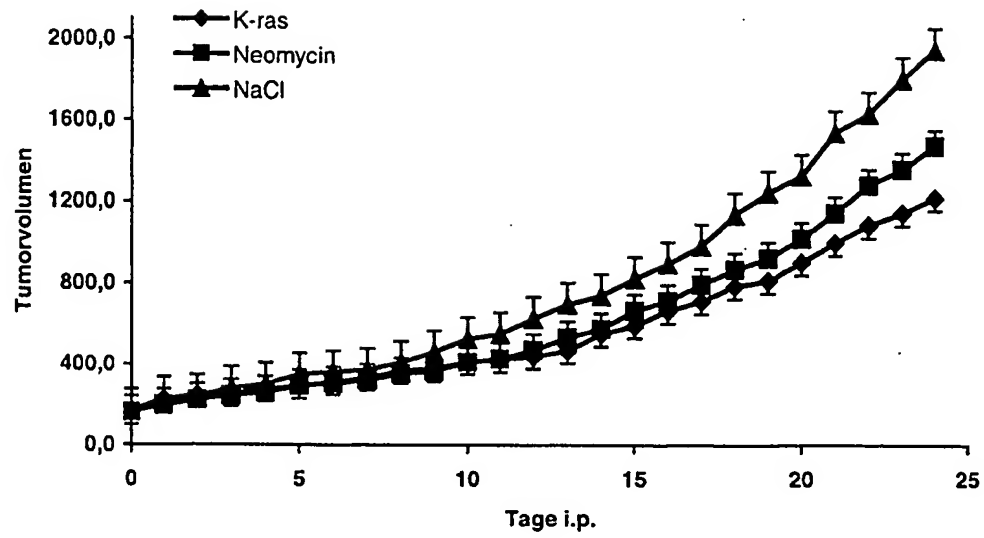


Fig. 3